

**Untersuchungen zur Hemmbarkeit von Pankreas- und
Submandibulariskallikrein vom Schwein
durch deren Antikörper**

Ingrid Paletta

1980



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Abteilung für Klinische Chemie und Klinische Biochemie
der chirurgischen Klinik an der Universität München

Vorstand Prof. Dr. H. Fritz

Untersuchungen zur Hemmbarkeit von Pankreas- und Submandibulariskallikrein vom Schwein durch deren Antikörper.

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Ingrid Paletta

aus

München

1980

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität
München

Berichterstatter: Prof. Dr. H. Fritz

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 15.1.1980



Herrn Professor Dr. H. Fritz möchte ich für die Überlassung des Themas und die Erlaubnis, diese Arbeit in seiner Abteilung durchzuführen, danken.

Außerdem gilt mein Dank Frau Dr.med. B. Dittmann für ihre Anregung und die Unterstützung bei der Fertigstellung der Arbeit.

- Meinem lieben Onkel und meiner lieben Tante
aus der Schweiz in Dankbarkeit gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
EINLEITUNG	1
I Zur Biochemie und Funktion der Kallikreine	2
I/1 Zur Biochemie der Kallikreine	2
I/2 Zur Physiologie und Pathophysiologie der Kallikreine/Kinine	4
I/3 Vergleich zwischen Submandibularisdrüsen- und Pankreaskallikrein vom Schwein	5
I/4 Aktivitätseinheiten	6
II. Antikörperbildung (Kaninchen) gegen Submandibulariskallikrein (vom Schwein) durch Immunisierung	7
III Isolierung von IgG aus Säugetierserum mittels Caprylsäure	9
IV Wirkungsweisen der Antikörper auf Enzyme	10
IV/1 Die drei Hemmtypen	10
a) Kompetitive Hemmung	10
b) nicht-kompetitive Hemmung	10
c) allosterische Hemmung	10
IV/2 Steigerung und Stabilisierung der Aktivität der Enzyme durch Antikörper	11
IV/3 Betrachtungen über die Beschaffenheit der antigenen Determinanten	12
V Bestimmung der esterolytischen Aktivität vom Pankreas- und Submandibulariskallikrein vom Schwein mittels des BAEE-Testes	13
V/1 Erwähnung verschiedener Meßmethoden zur Aktivitätsbestimmung	13

	Seite
V/2 Testvorbereitungen	14
V/3 Herstellung der Lösungen für ca. 25 Einzelexperimente	14
V/4 Notwendige Geräte zur Versuchsdurchführung	15
V/5 Testdurchführung	15
a) Verdünnungsreihe mit Submandibulariskallikrein vom Schwein in steigender Konzentration	17
b) Verdünnungsreihe mit Pankreaskallikrein vom Schwein in steigender Konzentration	18
c) Kurve der Mittelwerte der Titration von Pankreaskallikrein mit Anti-Pankreaskallikrein-IgG	20
d) Kurve der Mittelwerte der Titration von Submandibulariskallikrein mit Anti-Submandibulariskallikrein - IgG	21
e) Titration Pankreaskallikrein gegen unspezifisches IgG	23
f) Titration Submandibulariskallikrein gegen unspezifisches IgG	24
g) Titration Pankreaskallikrein gegen Anti-Submandibulariskallikrein -IgG	26
h) Titration Submandibulariskallikrein gegen Anti-Pankreaskallikrein -IgG	27
DISKUSSION	28
ZUSAMMENFASSUNG	30
LITERATUR	31

EINLEITUNG

Die Entdeckung einer Substanz vor ca. 50 Jahren durch E.K. Frey in der Münchner chirurg. Universitätsklinik, die intravenös appliziert den Blutdruck beim Hund senkt, markiert die Entdeckung des Kallikrein-Kinin-Systems (1).

Durch zahlreiche Experimente konnte erforscht werden, daß das Kallikrein-Kinin-System an vielen wichtigen Stoffwechselvorgängen und der Kreislaufregulierung beteiligt ist (1).

Die Kallikreine werden heute allgemein in Plasmakallikreine und die Drüsenkallikreine eingeteilt. Die Drüsenkallikreine scheinen dabei untereinander sehr ähnlich zu sein (Fritz et al., 1977) (2). Diese Vermutung stützt sich auf die nur geringfügig unterschiedlichen isoelektrischen Punkte, die ähnliche Bandenaufteilung in der SDS-Gelelektrophorese (3, 4, 5, 6), das fast gleiche Molekulargewicht und die identische N-terminale Aminosäuresequenz bei Submandibularis- und Pankreaskallikrein.

In diesem Zusammenhang ist es von besonderem Interesse, auch das enzymologische Verhalten der Drüsenkallikreine zu vergleichen.

Wie weiter unten gezeigt wird, weisen die Kallikreine aus der Submandibularisdrüse und dem Pankreas fast gleiche Umsatzraten auf. Weiterhin werden sie durch die jeweils speziellen Antikörper, die aus Kaninchenserum gewonnen wurden, praktisch vollständig gehemmt. Die Antikörper besitzen allem Anschein nach eine außerordentlich hohe Spezifität, da der Test auf eine Kreuzreaktion negativ ausfiel.

Es war Aufgabe der folgenden Arbeit, das enzymatische Verhalten von Submandibulariskallikrein und Pankreaskallikrein unter dem Einfluß der spezifischen Antikörper zu untersuchen.

I Zur Biochemie und Funktion der Kallikreine

I/1 Zur Biochemie der Kallikreine

Kallikreine sind Proteasen, die spezifisch aus dem Substrat Kininogen, einem α_2 -Globulin, Kinine freisetzen. Letztere sind die eigentlichen Effektoren des Kallikrein-Kinin-Systems.

Je nach ihrer Herkunft unterscheidet man 2 Gruppen von Kallikreinen, die Organ- oder Drüsenkallikreine und das Plasmakallikrein.

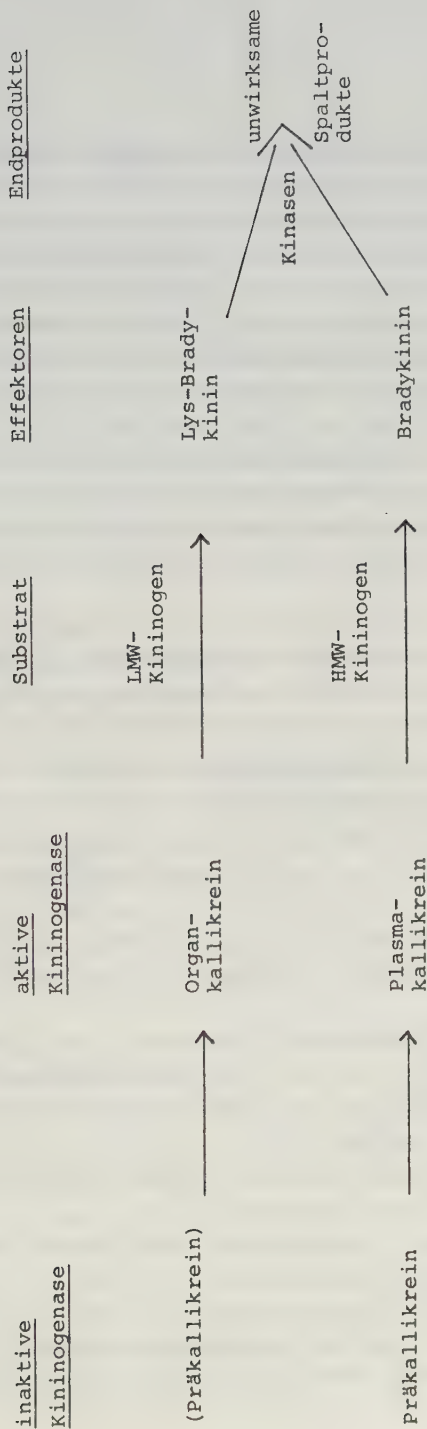
Organkallikreine kommen im menschlichen und tierischen Organismus vor allem in den Speicheldrüsen, im Pankreas, in der Darm-schleimhaut sowie im Harn vor (7).

Beim Harnkallikrein ist man sich noch nicht im klaren darüber, ob es sich um filtrierte Organkallikreine handelt oder um ein in den Nieren selbst synthetisiertes Kallikrein.

Der Hauptunterschied der beiden Kallikreingruppen besteht im Molekulargewicht (Plasmakallikrein bei 100 000, Organkallikreine bei 33 000), und in der unterschiedlichen Substratspezifität (8).

Während das Plasmakallikrein bevorzugt aus dem hochmolekularen (HMW) Kininogen Bradykinin = H-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg-OH freisetzt, liberieren die Organkallikreine bevorzugt aus dem niedermolekularen (LMW) Kininogen Kallidin = Lys-Bradykinin, und zwar jeweils durch Spaltung zweier Peptidbindungen (2), vgl. das Schema.

Die Kallikrein-Kinin-Systeme



I/2 Zur Physiologie und Pathophysiologie der Kallikreine/Kinine

Die freigesetzten Kinine sind pharmakologisch äußerst aktiv. Schon in geringen Mengen senken sie den Blutdruck, da sie die peripheren Arteriolen erweitern. Sie erhöhen die Permeabilität der Kapillaren und spielen somit eine Rolle als Entzündungsmediatoren. Glattmuskuläre Organe wie Darm und Uterus werden kontrahiert. Bei Kontakt mit bestimmten Nervenfasern wirken sie schmerzerzeugend.

Inwieweit die Kininfreisetzung für die Schmerz- und Schocksymptomatik verantwortlich zu machen ist, ist Gegenstand einer Vielzahl von Untersuchungen. Daß diese Symptome ausschließlich auf einer Kininliberierung beruhen, ist nach Creuzfeldt (10) unwahrscheinlich.

Fest steht aber, daß z.B. bei der akuten Pankreatitis die beobachteten Gefäßveränderungen wie Vasodilatation mit Stase, Thrombose und Hämorrhagien zumindest teilweise auf die Wirkung der Kallikreine bzw. Kinine zurückgeführt werden können (7).

Ebenso stehen folgende pathologische Erscheinungen mit dem Kallikrein-Kinin-System im Zusammenhang:

Akute und chronische Allergien, Anaphylaxien, Endotoxinschock, Schockzustände infolge von Verbrennungen und Traumata, Arthritiden und Gicht.

Das hereditäre, angioneurotische Oedem beruht auf einem Mangel an C1-Esterase-Inaktivator, einem potentiellen Inhibitor des Plasmakallikreins.

Zur Physiologie der Kinine wäre zu erwähnen, daß - anhand neuester Forschungsergebnisse - die Kinine für den Stofftransport durch Zellmembranen, speziell für den Glukosetransport in die Zelle, eine wichtige Rolle spielen (11).

Ferner wird diskutiert, ob die Kallikreine am Stoffrücktransport in die Nierentubuli beteiligt sind.

Auch bei der endogenen Blutgerinnung kommt dem Kallikrein-Kinin-System eine wichtige Rolle zu:

Der Hagemannfaktor (XII) ist zusammen mit dem Präkallikrein und dem HMW-Kininogen im Aktivierungskomplex assoziiert.

Das HMW-Kininogen wirkt dabei als Cofaktor bei der Festphasenak-

tivierung des Hagemannfaktors mit. Tatsächlich läuft auch beim Fehlen entweder des Präkallikreins ("Fletcher-trait") oder des HMW-Kininogens ("Fitzgerald - und Williams - trait") die Blutgerinnung in vitro verlangsamt ab, die "Patienten" sind jedoch asymptomatisch.

Da der aktivierte Faktor XII a über die Aktivierung des Plasminogenproaktivators zum Plasminogenaktivator zur Freisetzung von Plasmin führt, welches Fibrin und Fibrinogen abbaut, spielt das Kallikrein-Kinin-System (eben über die Verknüpfung mit dem Faktor XII) auch bei der Fibrinolyse eine Rolle:

Bei einem Mangel an Präkallikrein oder HMW-Kininogen läuft die Fibrinolyse verzögert ab; bei einer Aktivierung des Kallikrein-Kinin-Systems haben wir es mit einer verstärkten Fibrinolyse zu tun (11).

I/3 Vergleich zwischen Submandibularisdrüsen- und Pankreaskallikrein vom Schwein.

Aus den bisher publizierten Versuchsergebnissen läßt sich folgender Vergleich zwischen diesen Kallikreinen aufzählen:

Beide Kallikreine sind Serinproteasen und zeichnen sich durch ihre hohe Substratspezifität aus (8).

Die Aminosäurezusammensetzung der zwei Kallikreine ist sehr ähnlich und unterscheidet sich nur durch die drei Aminosäuren - Threonin, Histidin und Lysin -, die beim Submandibulariskallikrein im Molekül zusätzlich vorhanden sind (2).

Ein Molekulargewicht von 33 000 ist für beide Kallikreine als obere Grenze anzusehen (8).

Der Anteil an Kohlehydraten liegt im Submandibulariskallikrein höher als im Pankreaskallikrein (2).

Das Submandibulariskallikrein kommt nur in einer aktiven Form vor, das Pankreaskallikrein liegt jedoch auch in einer inaktiven Form, als sog. Präkallikrein, vor (4).

In ihrer spezifischen Aktivität scheinen sich diese Kallikreine etwas zu unterscheiden, was vermutlich darauf zurückzuführen ist, daß das Submandibulariskallikrein eine Polypeptid-Kette besitzt, das Pankreaskallikrein zwei (Kette A und B).

Die in der Elektrophorese langsamer wandernde B-Form und die A-Form sind Ausdruck einer Heterogenität, die durch unterschiedlichen Kohlehydratgehalt bedingt ist (12).

In früheren Versuchen mit synthetischen Hemmstoffen wurden gleiche Inaktivierungsgeschwindigkeiten mit Diisopropylphosphofluorid (DFP) als Inhibitor beobachtet (5), während sich die Hemmkurven bei Verwendung von Peptidchlormethylketon als Hemmstoff bei diesen Kallikreinen unterschieden (13).

Gleiche Hemmstärken wurden allerdings wieder beobachtet, als das Peptidsubstrat S-2266 (D-Val-Leu-Arg-P-nitroanilid) von Kabi benutzt wurde, um das Verhalten von natürlich vorkommenden Inhibitoren gegenüber den Kallikreinen zu untersuchen (2).

Die Peptide Leupeptin und Antipain, erwiesen sich für beide Kallikreine als starke Inhibitoren (14).

Bei den Immundiffusions-(Methode nach Ouchterlony) und Immunelektrophoreseversuchen zeigte sich immunologische Kreuzreaktion zwischen den drei Drüsenkallikreinen des Schweins (2).

I/4 Aktivitätseinheiten

Zur Bestimmung der Aktivität der Kallikreine wird deren esterolytische und biologische Wirkungsweise herangezogen. Die esterolytische Aktivität wird in Internationalen Einheiten (U) angegeben. 1 U ist die Menge Enzym, die pro Minute ein μMol Substrat unter definierten Bedingungen spaltet. Die biologische Kallikreineinheit ist durch die blutdrucksenkende Wirkung der durch Kallikrein freigesetzten Kinine definiert.

II. Antikörperbildung gegen Submandibulariskallikrein vom Schwein durch Immunisierung von Kaninchen

1. Notwendige Reagenzien

Lösung 1: 2 mg Kallikrein in 0,95 ml Puffer gelöst

Lösung 2: 0,9 % NaCl-Lösung

Lösung 3: komplettes Freund'sches Adjuvants

2. Zusammensetzung der Injektionslösung für Grundimmunisierung:

0,64 ml Lösung 1 (= 1,34 mg Kallikrein-Protein)

+ 1,16 ml Lösung 2

+ 1,80 ml Lösung 3

= 3,60 ml Injektionslösung mit einem Gesamtproteingehalt von 1,34 mg Kallikrein entsprechend 0,372 mg Protein/ml.

Mit dieser Injektionslösung werden 2 Kaninchen immunisiert; es ergibt sich also pro Kaninchen ein Gehalt von 0,67 mg Kallikrein/1,8 ml Injektionslösung. Da an acht Stellen appliziert wird, befinden sich in jeder Spritze 0,084 mg Kallikrein/0,225 ml.

Grundimmunisierung:

Jedem Kaninchen werden vor der Immunisierung aus der Ohrvene 2,5 ml Blut entnommen und das daraus gewonnene Serum bei -70°C eingefroren.

Nach Rasur des Rückens Kennzeichnung der acht Injektionsstellen und Desinfektion injiziert man die Kaninchen intradermal, wobei Quaddeln deutlich sichtbar werden.

Am 22. Tag nach der Grundimmunisierung erfolgt die erste Boostierung i.v., am 29. Tag die 2. Boosterung. Es werden jeweils 0,05 ml Lösung 4 ($\hat{=}$ 2 mg Kallikrein in 0,95 ml Puffer gelöst) und 1 ml Lösung 5 ($\hat{=}$ 0,9 % NaCl-Lösung) injiziert.

Blutentnahme:

Die Kaninchen werden mittels Herzpunktion entblutet. Man erhält pro Kaninchen etwa 100 - 200 ml Blut.

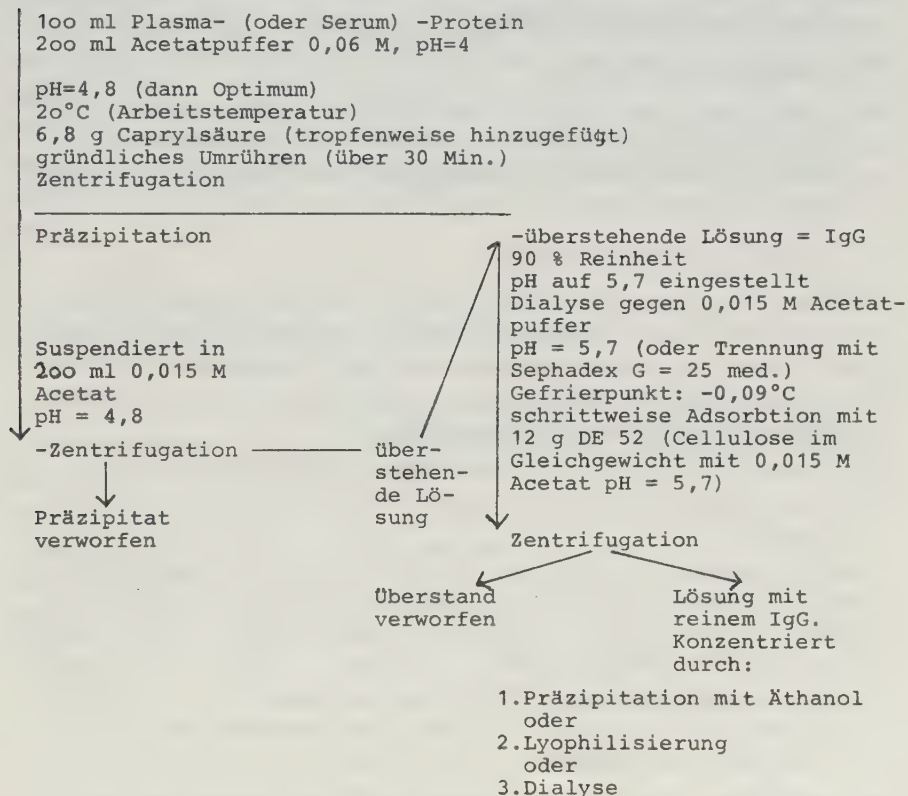
Durch Zentrifugation des geronnenen Blutes erhält man das Serum, in dem sich die Antikörper befinden.

Die Blutentnahme wird am ersten Tag der Grundimmunisierung durchgeführt und am 7., 14., 22., 29. und 35. Tag nach der Grundimmunisierung wiederholt.

III Isolierung von IgG aus Säugetierserum mittels Caprylsäure (15)

Nachdem es bereits gelungen war mit Hilfe von Caprylsäure IgA und α_2 -Makroglobuline rein darzustellen (16, 17, 18), versuchte man nun IgG zu isolieren.

Dies gelang mit folgender Versuchsdurchführung:



Das so gewonnene und schließlich isolierte, konzentrierte und dialysierte IgG erwies sich in der Ultrazentrifuge und Elektrophorese als homogen.

IV Wirkungsweisen der Antikörper auf Enzyme

IV/1 Die drei Hemmtypen (19, 20)

Im allgemeinen führt das Zusammenwirken von Enzymen mit ihren spezifischen Antikörpern zu einer Verminderung der enzymatischen Aktivität.

Aufgrund zahlreicher Versuchsdurchführungen konnte man drei verschiedene Hemmtypen beobachten:

a) Kompetitive Hemmung:

der Antikörper konkuriert mit dem Substrat um die Bindung am aktiven Zentrum; die Voraussetzung dafür ist im allgemeinen eine strukturelle Ähnlichkeit von Antikörper und Substrat im Bindungsbereich.

b) nicht kompetitive Hemmung:

der Antikörper reagiert mit Stellen auf dem Enzymmolekül, die dem aktiven Zentrum direkt benachbart sind oder in unmittelbarer Nähe liegen, so daß das Substrat zwar noch gebunden werden kann, der Reaktionsablauf dadurch aber verlangsamt ist: z.B. Hemmung des Papain durch Anti-Papain-Antikörper.

Das Ausmaß der Hemmung steht auch im direkten Verhältnis zur Größe des Substrats: Je größer das Substrat, umso höher der Grad der Hemmung.

Auch die Aggregatbildung führt zu einer Art nicht-kompetitiver Hemmung, solange sie mit dem Zugang des Substrats zur katalytischen Seite des Enzyms interferiert. Dies wurde an der Glykogen-Phosphorylase (Michaelis 1964) sowie Papain (Saphira und Arnon 1967) und Kathepsin (Dingle 1971) nachgewiesen.

c) allosterische Hemmung:

der Antikörper besetzt eine andere Stelle des Enzyms als das Substrat. Durch seine Anlagerung bewirkt er eine Konformationsänderung und erschwert oder verhindert somit die Bindung des Substrats an das Enzymmolekül.

Es kann jedoch auch zu einer allosterischen Aktivitätssteigerung kommen.

Das Ausmaß der Hemmung oder Aktivierung durch den Antikörper korreliert mit der Spezifität der Antikörper zu der entsprechenden antigenen Determinante.

Auf diese Weise ist es möglich einen Hinweis auf die Beschaffenheit und die Verteilung der verschiedenen antigenen Determinanten des Enzymmoleküls zu erhalten.

Diesen Hemmungstyp beobachteten erstmals Cinader und seine Mitarbeiter (21).

Später konnten u.a. eine Aktivierung der Penicillinase (22) und Ribonuclease (21) und eine Hemmung des Trypsins (22) festgestellt werden.

Theoretisch lassen sich die drei Hemmtypen gut voneinander abgrenzen. In der Praxis trifft man die reinen Hemmtypen äußerst selten an; hier überwiegen Kombinationen aus allen drei Hemmtypen.

IV/2 Steigerung und Stabilisierung der Aktivität der Enzyme durch Antikörper

In manchen Fällen üben Antikörper auf die Enzymaktivität einen positiven Effekt aus. Sie können die Aktivität des Enzyms steigern und das Enzym stabilisieren.

Dies ist meist der Fall, wenn die Reaktionsbedingungen nicht optimal sind, wenn also reines Substrat oder mutierte Enzyme, die selbst nur geringe katalytische Aktivität besitzen, verwendet werden, oder die Enzyme den Reaktionsbedingungen gegenüber labil sind, wie z.B. gegenüber Hitze oder einem erhöhten pH-Wert (19).

Der Antikörper erzwingt am Enzymmolekül eine Konformationsänderung, die normalerweise erst durch die Anlagerung des Substrats an das aktive Zentrum zustande kommt.

IV/3 Betrachtungen über die Beschaffenheit der antigenen Determinanten

Eine Besonderheit der Enzymhemmung durch ihre spezifischen Antikörper liegt darin, daß selbst bei Zugabe extremer Mengen von Antikörpern eine Restaktivität erhalten bleibt (19).

Dies läßt sich wie folgt erklären:

1. Es ist möglich, daß jedes Enzymmolekül durch den Antikörper nur partiell gehemmt wird, und somit eine gewisse Restaktivität bestehen bleibt.
2. Der Antikörper muß von vornherein als uneinheitlich betrachtet werden, wobei sich die einzelnen Subantikörper in ihrer inhibitorischen Wirkung unterscheiden.
Der weitaus größere Teil der Antikörper wirkt über eine nicht-kompetitive Hemmung wobei gleichzeitig Präzipitate gebildet werden, während der kleinere Teil der Antikörper direkt gegen das aktive Zentrum gerichtet ist.

V Bestimmung der esterolytischen Aktivität von Pankreas- und Submandibulariskallikrein vom Schwein mittels des BAEE-Testes

V/1 Erwähnung verschiedener Meßmethoden zur Aktivitätsbestimmung

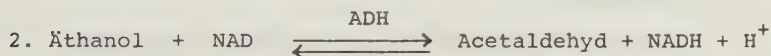
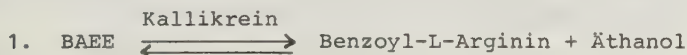
Da alle Kallikreine biologische und esterolytische Aktivitäten besitzen, stehen zur quantitativen Bestimmung der Kallikreinaktivität folgende Möglichkeiten offen:

Vergleich der blutdrucksenkenden Wirkung am Hund mit einem Standardpräparat, z.B. Padutin (Bayer Leverkusen) (7).

Optische Messung der Kallikreinaktivität anhand der esterspaltenden Wirkung (23, 24). Als Substrat zur Messung der esterolytischen Wirkung eignet sich besonders Benzoyl-L-Argininäthyl-Ester (BAEE).

Die relativ gute Handhabung und vor allem die große Exaktheit des zuletzt genannten Testes prädestinierte ihn für diese Versuchsreihe.

Prinzip dieser Methode ist:



Die pro Zeiteinheit umgesetzte Menge Äthanol, gemessen an der Zunahme der NADH-Extinktion bei 366 nm, ist ein Maß für die Kallikreinaktivität.

V/2 Testvorbereitungen

1. Substanzen zur Durchführung des Testes:

Natriumphosphat, $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10 \text{ H}_2\text{O}$

Semicarbacid

Glycin

Natronlauge, 2 N

Nicotin- adenin-dinucleotid, NAD

Benzoyl-argininäthylester als Hydrochlorid

Alkohol-Dehydrogenase ADH, aus Hefe kristallisiert
(Suspension in 2,4 M)

Ammoniumsulfatlösung = 200 U/mg

Getestete Substanzen:

Pankreaskallikrein vom Schwein, gereinigt.
1289,625 KE/mg (Gruppe F.Fiedler)

Submandibulariskallikrein vom Schwein, gereinigt.
1351,5 KE/mg
(Gruppe Fiedler, M. Lemon)

-Immunglobuline aus Kaninchenserum mit spezifischem
Antikörper.

a) Immun-Globulin mit Antikörper gegen Submandibularis-
kallikrein (Schwein) NR 57

b) Immun-Globulin mit Antikörper gegen Pankreaskalli-
krein (Schwein) TRS 1273 = kan A 325

- Immun-Globuline aus Kaninchenserum ohne spezifischen
Antikörper.

c) Immunglobulinfraktion aus Normalkaninchenserum
(Pool) TRS 1234 A.

V/3 Herstellung der Lösungen für ca. 25 Einzelexperimente

1. Pyrophosphat-Semicarbacid-Glycinpuffer: Dazu wurden
15,7 g $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10 \text{ H}_2\text{O}$ + 4,1 g Semicarbacid + 0,9 g
Glycin in bidest. Wasser gelöst, mit 2 N NaOH auf pH =
8,7 eingestellt und anschließend mit bidest. Wasser

- auf 500 ml aufgefüllt. (Lösung 1)
2. Nicotin-adenin-dinucleotid (NAD): 60 mg NAD wurden in 3 ml bidest. Wasser gelöst (ca. 30 mM NAD) (Lösung 2)
 3. Benzoyl-L-argininäthylester (BAEE): Hierzu wurden 34,8 mg BAEE (L-Form) in 15 ml bidest. Wasser gelöst (6 mM BAEE) (Lösung 3)
 4. Alkoholdehydrogenase (ADH) (30 mg Enzymprotein /ml) (Lösung 4)
 5. Kallikreinlösung: 30 µg Kallikrein wurden in 1 ml 0,9 % NaCl pH = 7,0 gelöst (Lösung 5)
 6. IgG: 5 mg IgG wurden in 1 ml 0,9 % NaCl pH = 7,0 gelöst (Lösung 6)

Es zeigte sich, daß Lösungen 1 und 2 ca. 1 Woche, Lösung 3 für 1 - 2 Tage (bei 0 °C bis 4 °C) und Lösung 4 für einige Monate stabil blieben.

V/4 Notwendige Geräte zur Versuchsdurchführung

Spektralphotometer zur Messung der Experimente bei 366 nm, temperierbare Küvettenhalter bei 25 °C, Wasserbad mit Umwälzpumpe; Stoppuhr.

V/5 Testdurchführung

Bestimmungsansatz:

Das Testvolumen von 3 ml in der Küvette wurde wie folgt zusammengesetzt:

2,30	ml	Pufferlösung	1 - x Antikörperanteil
0,10	ml	NAD-Lösung	2
0,02	ml	ADH-Suspension	4
0,50	ml	BAEE-Lösung	3
0,10	ml	Kallikreinlösung	5
x	µl	Antikörper	
3,0	ml		

Dabei wurden die Lösungen 1, 2 und 3 10 Minuten bei 25 °C inkubiert, so dann das 7 Minuten vorinkubierte Gemisch aus Kallikrein- und Antikörperlösungen hinzugefügt und die Reaktion mit 20 µl ADH-Suspension gestartet.

Einer guten Durchmischung der Lösungen miteinander und der genauen Einhaltung von 25 °C - auch im Küvettenhalter - kommt für die Genauigkeit des Testes eine große Bedeutung zu.

Für die Gewinnung des Leerwertes wurde die Kallikrein- und IgG-Lösungsmenge durch eine gleich große Menge von Pufferlösung ersetzt. Der so gewonnene Leerwert wurde später von den einzelnen Meßergebnissen mit Kallikrein abgezogen, um den durch die Sontanhydrolyse des BAEE verursachten Fehlers zu eliminieren.

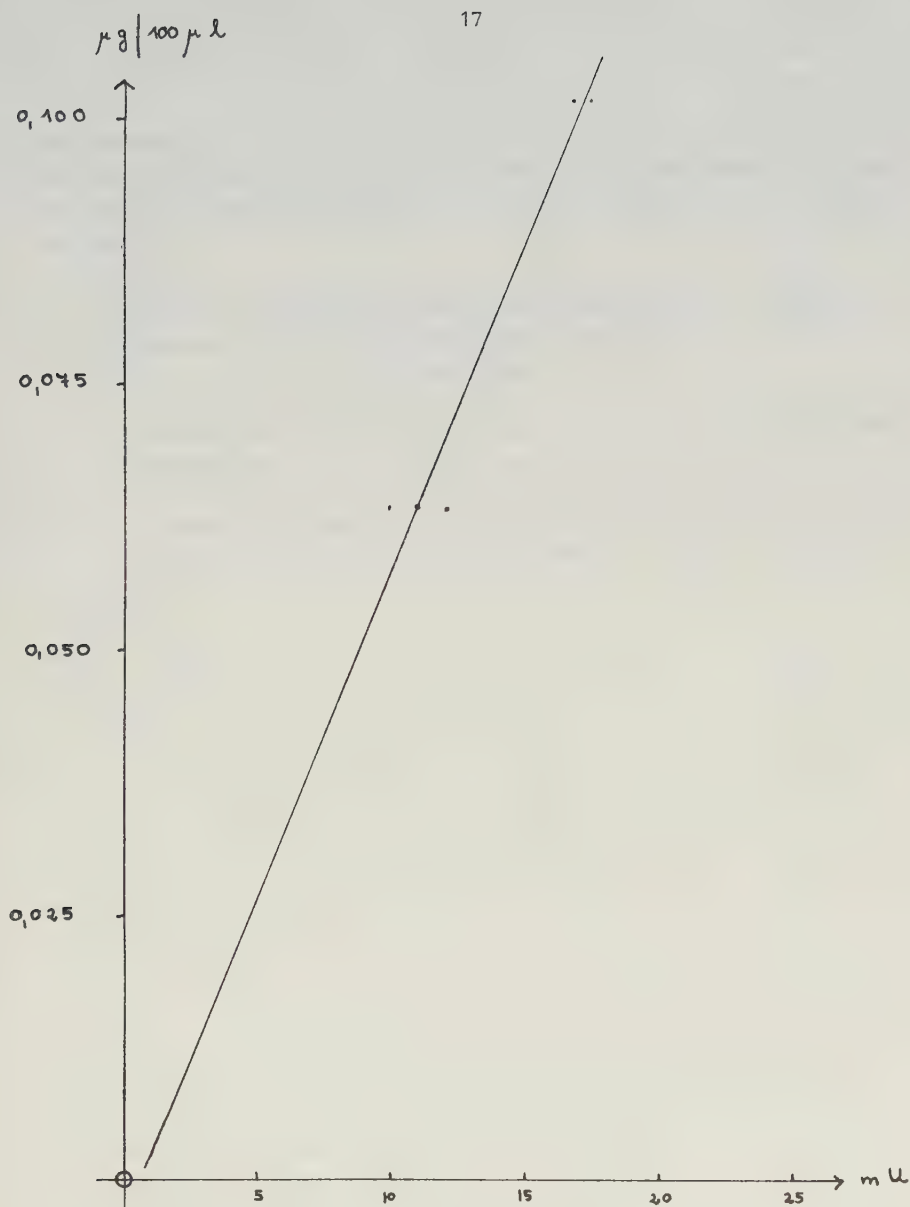
Es wurden gleichzeitig sechs Enzymkinetiken (in Küvetten) bestimmt. Ein angeschlossener Rechner mit Drucker lieferte nach Eingabe eines geräteinternen Faktors für jede Küvette die Aktivität in mU/min. Zusätzlich druckte das Gerät drei Kontrollzahlen zur Überprüfung des linearen Verlaufs der Reaktion aus.

Die ungehemmte Aktivität der in den Küvetten eingesetzten Kallikreinmenge wurde über eine Verdünnungsreihe nach den oben beschriebenen Meßverfahren bestimmt:

Der rechnerische 100 %-Wert beträgt für

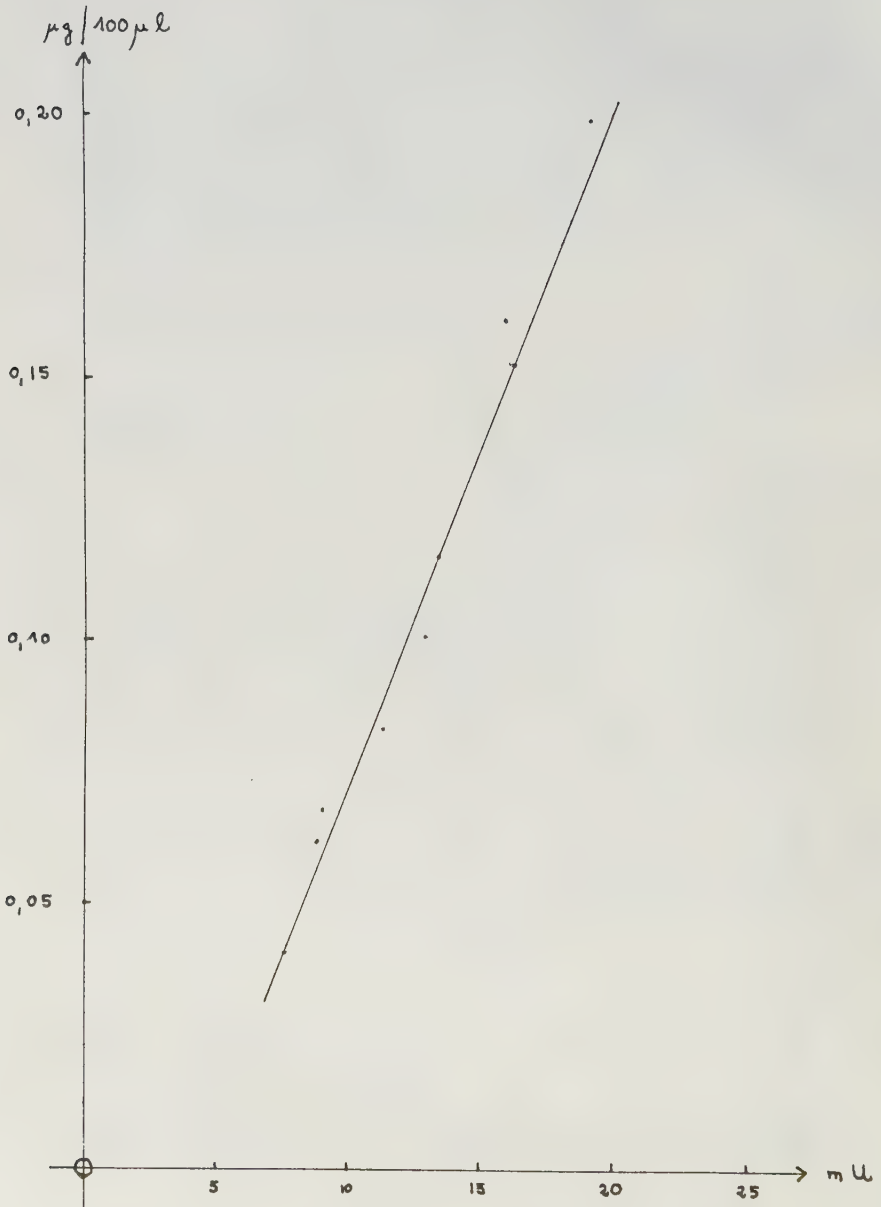
3 µg Pankreaskallikrein /Küvette 292,4 mU/min. (Figur 1)
für

2 µg Submandibulariskallikrein/Küvette 332 mU/min. (Figur 2)



V/5a

Legende 1: Verdünnungsreihe mit Submandibulariskallikrein vom Schwein in steigender Konzentration (Sollwert 49,7 mU/300 μl)



V/5b

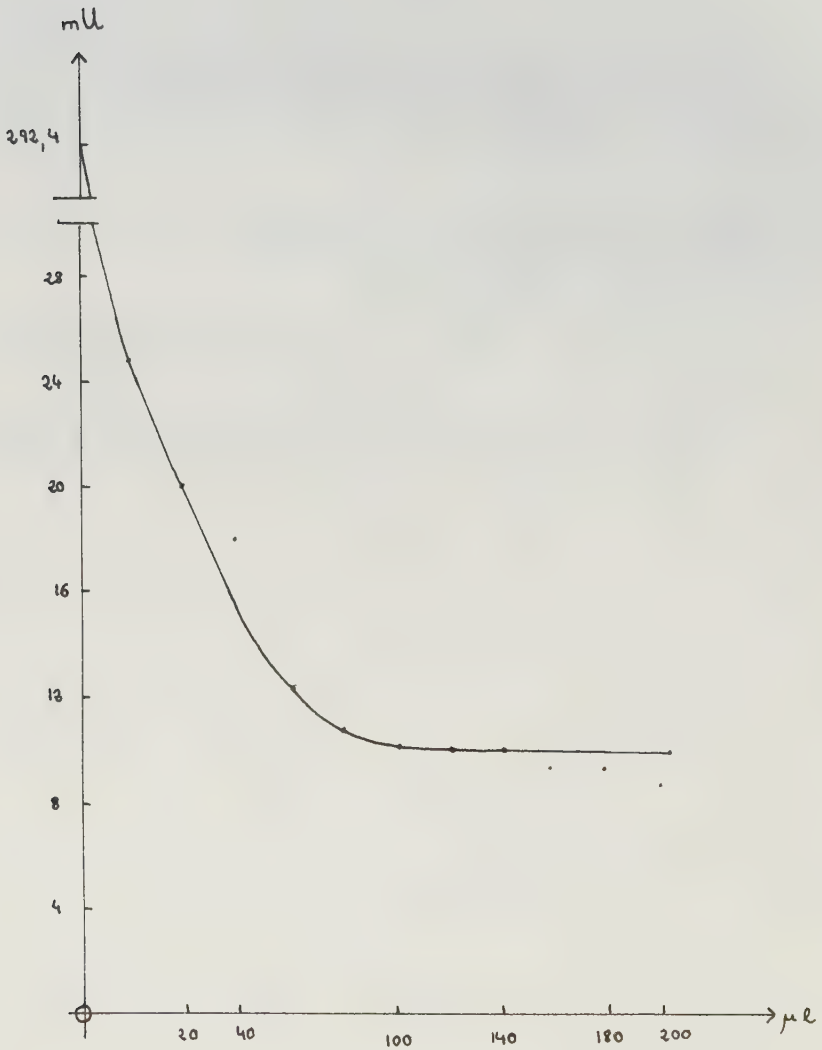
Legende 2: Verdünnungsreihe mit Pankreaskallikrein vom Schwein in steigender Konzentration.

Um Hemmkurven zu erhalten, wurden jeweils unterschiedliche Mengen der Antikörper-Lösungen den Testzusätzen beigemischt. Die spezifischen Antikörper sind in der isolierten IgG-Fraktion enthalten.

Die Hemmkurven wurden nach dem vorher beschriebenen Verfahren der ansteigenden IgG-Konzentrationen erstellt.

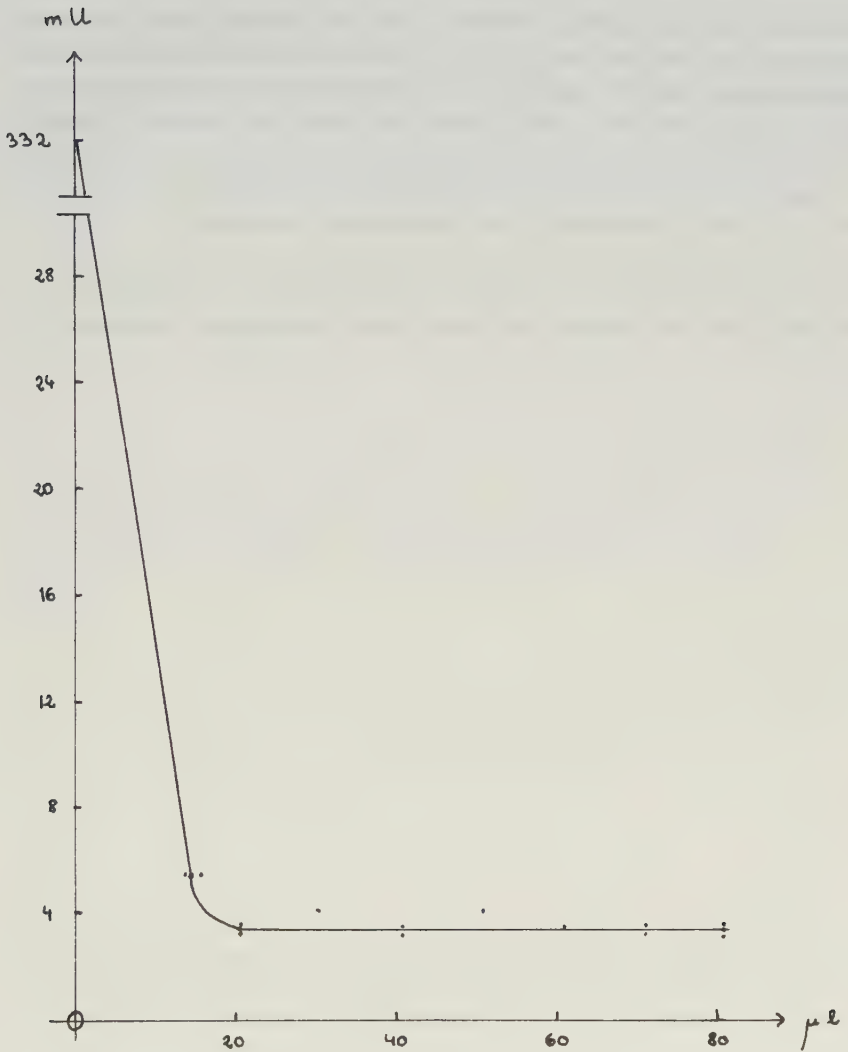
Es ergaben sich folgende Ergebnisse:

- a) Hemmung des Pankreaskallikreins durch seine spezifischen Antikörper 95 % (Figur 3)
- b) Hemmung des Submandibulariskallikreins durch seine spezifischen Antikörper 97 % (Figur 4)



V/5c

Legende 3: Kurve der Mittelwerte von Anti-Pankreaskallikrein-IgG
(5 mg/ml) gegen Pankreaskallikrein (3 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$).



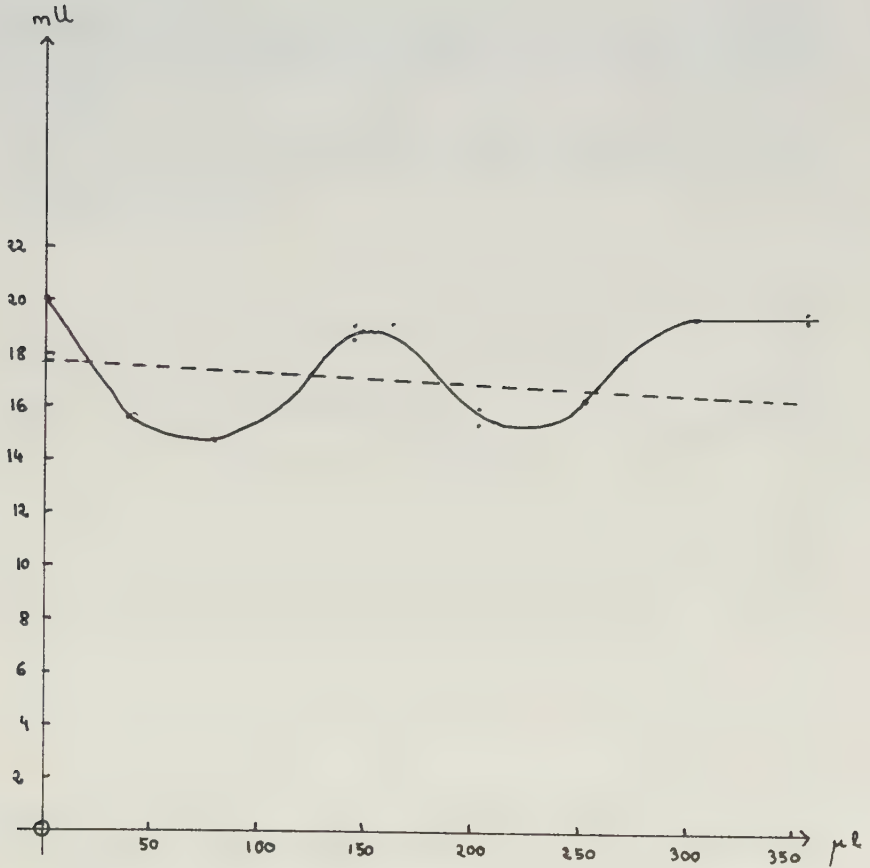
v/5d

Legende 4: Kurve der Mittelwerte von Anti-Submandibulariskallikrein-IgG
(5 mg/ml) gegen Submandibulariskallikrein (2 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$).

Um den Beweis antreten zu können, daß die Hemmung durch die spezifischen Antikörper und nicht allgemein durch die IgG-Fraktion hervorgerufen wurde mußten auch "Hemmkurven" der beiden Kallikreine gegen IgG ohne spezifische Antikörper aufgestellt werden.

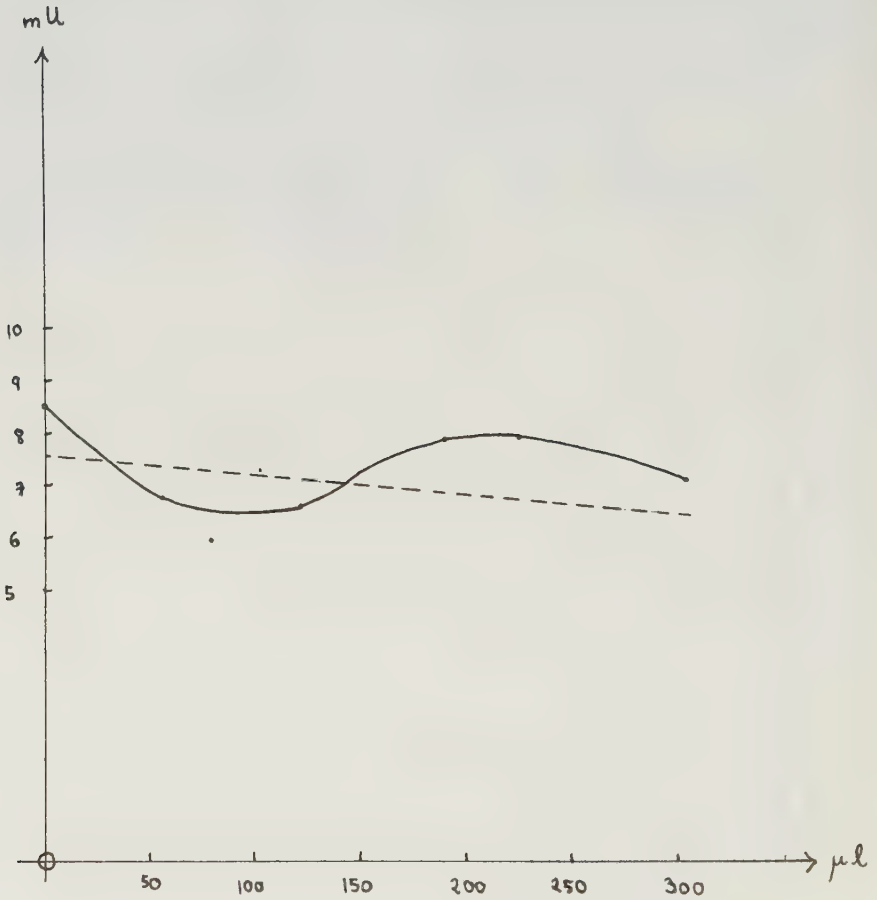
Es ergab sich eine Abnahme der Aktivität um ca. 25 - 30 % (Figur 5 und 6) gegenüber der ungehemmten Aktivität.

Der Hauptbestandteil der Hemmung aus der Figur 3 und Figur 4 ist also auf das Wirken der spezifischen Antikörper zurückzuführen.



V/5e

Legende 5: Pankreaskallikrein ($0,20 \mu\text{g}/100 \mu\text{l}$) gegen unspezifisches IgG ($5 \text{ mg}/\text{ml}$).



v/5f

Legende 6: Submandibulariskallikrein ($0,05 \mu\text{g}/100 \mu\text{l}$) gegen unspezifisches IgG (5 mg/ml).

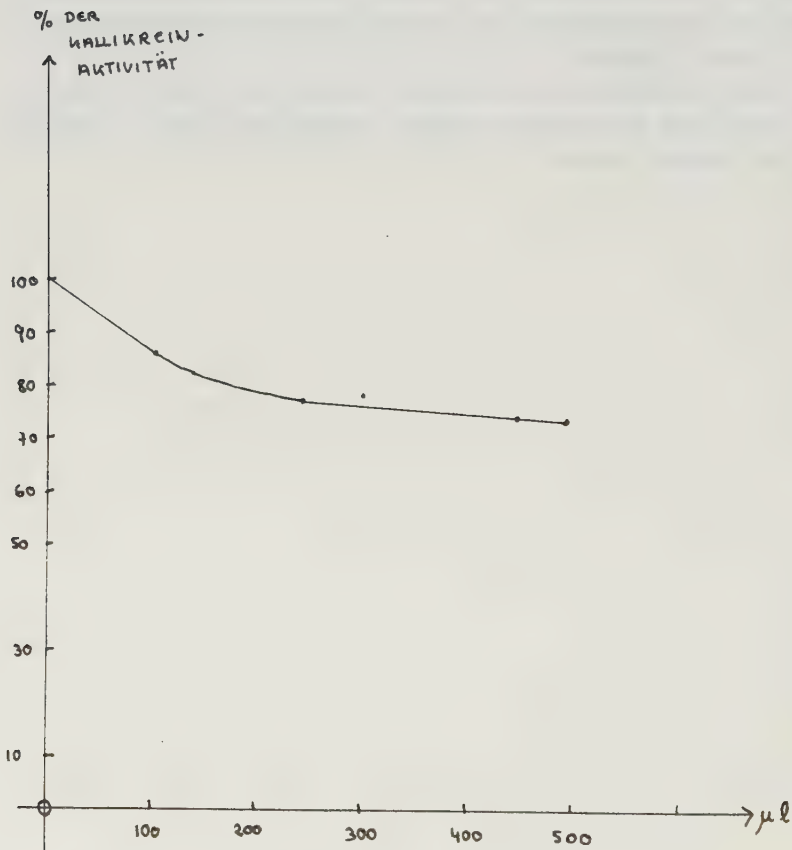
Kreuzreaktion:

Bei der Kombination Pankreaskallikrein/Antikörper gegen Submandibulariskallikrein

und

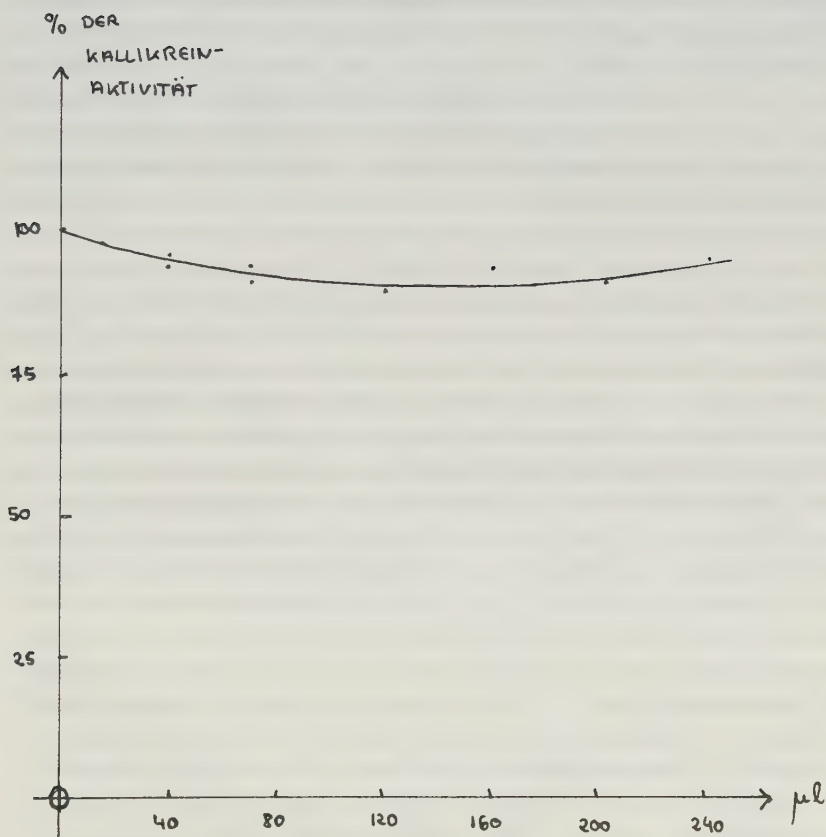
Submandibulariskallikrein/Antikörper gegen Pankreaskallikrein ergab sich keine Hemmung, die größer als die durch reine IgG wäre (Figur 7 und 8).

Aus dieser negativen Kreuzreaktion ergibt sich eine fehlende immunologische Ähnlichkeit zwischen Pankreaskallikrein und Submandibulariskallikrein.



V/5g

Legende 7: Pankreaskallikrein (0,20 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$) gegen Anti-Submandibularis-kallikrein - IgG (10 mg/ml).



V/5h

Legende 8: Submandibulariskallikrein ($0,05 \mu\text{g}/100 \mu\text{l}$) gegen Anti-Pankreas-kallikrein-IgG (5 mg/ml).

DISKUSSION

Mit Hilfe des BAEE-Testes wurde die Interaktion der Kallikreine aus Pankreas und Submandibularisdrüsen des Schweins mit ihren spezifischen Antikörpern untersucht. Die Hemmung der BAEE-Spaltung durch die spezifischen Antikörper ist bereits in kleinen Antikörpermengen mit ca. 95 % der eingesetzten Kallikreinaktivität überraschend groß.

Offensichtlich sind in der gewonnenen spezifischen Antikörperpopulation jeweils IgG-Moleküle vorhanden, die entweder direkt mit dem aktiven Zentrum reagieren oder aber durch eine räumlich benachbarte Bindung dieses so gut abschirmen, daß der Zutritt der BAEE-Moleküle nicht mehr möglich ist.

Aus der kleinen Menge benötigter Antikörper ist zu schließen, daß ihre Affinität zu den entsprechenden Haftstellen an den Kallikreinmolekülen sehr groß sein muß.

Interessanterweise findet bei den Hemmversuchen keine Kreuzreaktion zwischen dem Pankreaskallikrein und dem gegen Submandibulariskallikrein gerichteten Antikörper bzw. zwischen Submandibulariskallikrein und den Antikörpern gegen Pankreaskallikrein statt. Eine Kreuzreaktion findet man jedoch eindeutig bei der Immundiffusion (2). Bei letzterer kommen jedoch ausschließlich präzipitierende Antikörper zur Wirkung. Beim verwendeten enzymatischen Testsystem dagegen ist die molare Konzentration des Kallikreins jedoch wesentlich geringer (ca. 1000 x) als bei der Immundiffusion, so daß eine Präzipitatbildung nicht mehr erkennbar bzw. unwahrscheinlich ist. Es dürften sich dann im wesentlichen nur lösliche Aggregate bilden bzw. auch nicht präzipitierende Antikörper mit hoher Affinität zum Antigen zur Wirkung kommen. Die erzielten Resultate sprechen deshalb dafür, daß im verwendeten Testsystem überwiegend nicht-präzipitierende Antikörper mit sehr hoher Affinität zum aktiven Zentrum der Kallikreine wirksam werden. Ihre Selektivität spricht dafür, daß sich die beiden Organkallikreine im katalytisch aktiven Bereich oder in dessen näherer Umgebung, was die Haftstellen für die Antikörper betrifft, unterscheiden müssen. Dabei könnte schon der Austausch einer bzw. weniger Aminosäuren in der Primärstruktur bei ent-

sprechender Rückwirkung auf die Tertiärstruktur der Kallikreine für die beobachtete immunologische Spezifität verantwortlich sein.

Die offensichtliche Diskrepanz zwischen dem Ergebnis der Immundiffusion und dem enzymatischen Test dürfte durch die Annahme zu erklären sein, daß nur ein geringer Teil der jeweils spezifischen Antikörper gegen den enzymatisch aktiven Bereich des Kallikreinmoleküls gerichtet ist. Der weitaus größte Teil der Antikörper ist demnach gegen die Bereiche der Organkallikreine gerichtet, die gemeinsame Determinanten besitzen.

Was den Hemmtyp betrifft, so ist eine eindeutige Festlegung aufgrund der bislang gewonnenen Meßergebnisse nicht möglich. Mit großer Wahrscheinlichkeit scheidet jedoch eine kompetitive Hemmung der Kallikreine durch ihre Antikörper aus.

Das wesentliche Ergebnis der vorliegenden Arbeit ist die Erkenntnis, daß zumindest ein kleiner Anteil der durch übliche Immunisierung erhaltenen Antikörperpopulation gegen den aktiven Bereich der Kallikreinmoleküle gerichtet ist.

Weitere Versuche müssen zeigen ob es möglich ist, durch Änderung der Immunisierungsbedingungen diese für Untersuchungen der Struktur-Wirkungsbeziehungen interessante Antikörperpopulation in großer Menge zu produzieren.

ZUSAMMENFASSUNG

Aufgabe meiner Dissertationsarbeit war es, das enzymatische Verhalten von Submandibulariskallikrein und Pankreaskallikrein vom Schwein unter dem Einfluß spezifischer Antikörper (vom Kaninchen) zu untersuchen.

Mittels des enzymatischen Testsystems (BAAE-Test), konnten folgende Resultate erzielt werden:

1. Titrationsen des Pankreaskallikreins bzw. des Submandibulariskallikreins (vom Schwein) mit den jeweils spezifischen Antikörpern (aus Kaninchenserum) ergaben Hemmungen der enzymatischen Aktivitäten von 95 % bzw. 97 %.
2. Eine unspezifische Immunglobulinfraktion aus Kaninchenserum verursachte unter identischen Bedingungen ebenfalls eine Reduzierung der Aktivitäten der Kallikreine aus Pankreas bzw. Submandibularisdrüse. Diese unspezifische Hemmung führte jedoch nur zu einer maximalen Inhibierung von bis zu 30 % der Ausgangsaktivitäten.
3. Inkubierte man das Pankreaskallikrein mit dem Antikörper gegen Submandibulariskallikrein so lag die beobachtete Hemmung im Bereich des unspezifischen IgG-Kontrollwertes (Punkt 2), d.h. es fand keine Kreuzreaktion statt.
Ein analoges Ergebnis wurde für die Kombination Submandibulariskallikrein/Pankreaskallikrein-Antikörper erhalten.

Daraus kann gefolgert werden, daß die produzierten Antikörperpopulationen spezifische nur gegen das betreffende Organkallikrein gerichtete Antikörper enthalten.

LITERATUR

1. Frey E.K., Kraut H., Werle E.:
Das Kallikrein-Kinin-System und seine Inhibitoren.
Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart 1968 S. 1 - 9
2. International Symposium held at the Academy of Sciences and Literature at Mainz April 25th and 26th, 1977 Schattauer Verlag, Stuttgart New York Edited by G.L.Haberland, I.W. Rohen and T. Suzuki: Reprint from Kininogenases: Kallikrein S. 16 - 25
3. Fritz H., Eckert I., Werle E.:
Isolierung und Charakterisierung von sialinsäurehaltigem und sialinsäurefreiem Kallikrein aus Schweinepankreas.
Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 348: 1120-1132 (1967)
4. Fiedler F., Hirschauer C., Werle E.:
Anreicherung von Präkallikrein B aus Schweinepankreas und Eigenschaften verschiedener Formen des Pankreaskallikreins.
Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 351: 225 - 238 (1970)
5. Fiedler F., Müller B., Werle E.:
Charakterisierung verschiedener Schweinekallikreine mittels Diisopropylfluorophosphat.
Hoppe-Seylers physiol. Chem. 351: 1002 - 1006 (1970)
6. Habermann E.:
Trennung und Reinigung von Pankreaskallikreinen.
Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 328: 15 - 23 (1962)
7. Frey E.K., Kreut H., Werle E., Vogel R., Zickgraf-Rüdel G. und Trautschold I.:
Das Kallikrein-Kinin-System und seine Inhibitoren.
Ferdinand Enke Verlag Stuttgart (1968)
8. Hrsg. Erdös E.:
Handbuch der experimentellen Pharmakologie XXV "Bradykinin, Kallidin and Kallikrein."
Springer Verlag (1970)

9. Webster M.E.:
Report of the Comitte on nomenclature for hypotensive peptides in E.G. Erdös N Back und F. Sicutest; Hypotensive Peptides, Springer-Verlag New York 1966 und Pradykinin, Kallidin and Kallikrein in E.G. Erdös: Handbuch der experimentellen Pharmakologie, Springer-Verlag (1970)
10. Sigenthaler, W.: Klinische Pathophysiologie, S. 840
G. Thieme-Verlag Stuttgart (1976)
11. Sonderdruck aus "Ärztlicher Praxis" XXIX Jahrgang Nr. 86
(S. 3516) vom 25. Okt. 1977
Dr.med. Dittmann B.: Das Källikrein-Kinin-System
12. Fiedler F., Leysath G., Werle E.:
Hydrolysis of aminoacidesters by pig pandreatic Kallikrein.
Eur. J. Biochemie 36 152 - 159 (1973)
13. Fiedler F., Hirschauer C., Fritz H.:
Inhibition of three porcine glandular Kallikrein by
choloromethylketones.
Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 358 447 - 451 (1977)
14. Fritz H., Förg-Brey B., Umezawa H.:
Leupeptin and antipainstrong competetive inhibitors of
acromosal proteinase (boar acrosin) and kallikreins from
porcine organs (pancreas, submand.glands, urine).
Hoppe-Seylers Z. physiol.Chem. 354 1304 - 1306 (1973)
15. Steinbuch M. and Andran R.: Archieives of Biochemistry
and Biophysics 134 279 - 284 (1969)
16. Steinbuch M. Proc. 10th Congr. Intern. Soc. Blood Trans
Stockholm 1964, Karger, Basel (1965) p 1196
17. Hoch H. und Chanutin A., Arch. Biochemie and Biophysics
51 271 (1954)
18. Chanutin A. und Curnish, R.R., Arch. Biochemie and Bio-
physics 89 218 (1960)

19. Arnon R., Scritpum, Karolinska
Symposia on Research Methods in Reproductive Endocrinology
7th Symposium, Immunological Approaches to Fertility Control
July 29 - 31 (1974) S. 134 - 142

20. Karlson P., kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner
und Naturwissenschaftler.
G. Thieme Verlag Stuttgart 1972 S. 74 - 76

21. Pollock, M. R. (1964) Immunology 7, 707 - 710

22. Erickson, R.P. (1974) Immunochem. 11, 41 - 45

23. Trautschold I. und Werle E.,
Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 325, 48 (1961)

24. Werle E., Trautschold I. in Hoppe-Seylers Thierfelder:
Handbuch der physiologischen und pathologisch-chemischen
Analyse,
Springer Verlag, Band VI C 745 (1965)

25. Fritz H., Fiedler F., Dietl, T., Warwas T., Truscheit E.,
Kolb H.I., Mair G., Tschesche H.:
On the Relationships between Porcine Pancreatic,
Submandibular and Urinary Kallikreins.
Running title: Porcine Glandular Kallikreins.
Deutsche Forschungsgemeinschaft, Sonderforschungsbereich 51
(grants B/2, B/3, B/17) S. 8.

LEBENS LAUF

- 9.12.1953 Ich wurde als zweite Tochter des Volksschul-
lehrers, Johannes Paletta, und seiner Frau
Ilse, geb. Strictius, geboren.
- 1960 - 1964 Besuch der Volksschule in München-Oberföhring
bzw. in München-Schwabing
- 1964 - 1973 Besuch des städt. Willi-Graf-Gymnasiums
8. 6.1973 Abitur am Willi-Graf-Gymnasium
- 3.11.1973 Beginn des Medizin-Studiums an der Ludwig
Maximilians-Universität in München
26. 8.1975 Ärztliche Vorprüfung
31. 8.1976 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
31. 8.1978 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
- 25.10.1979 Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung.

